

Leishmania infantum IgG ELISA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu leishmaniózy u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití



Návod k použití pro produkt č. 9500
UDI-DI: 07640158219508



Předpokládané použití:

Sada *Leishmania infantum* IgG ELISA od společnosti Bordier je určena ke kvalitativní detekci protilátek IgG proti larvám *Leishmania infantum* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

Pozadí:

Leishmanióza je nemocí přenášenou bacionosičem, jímž je blecha písečná. Infekci způsobují různé druhy intracelulárního prvoka rodu *Leishmania*. Infekci u člověka způsobuje 21 z 30 druhů, o nichž je známo, že napadají savce. Nejběžnější formou onemocnění je kožní leishmanióza, která způsobuje kožní poruchy, a viscerální leishmanióza, která obvykle působí na slezinu, játra a kostní dřeň. Hlavními symptomy jsou horečka, zvětšená slezina a kožní projevy. Diagnóza viscerální leishmaniózy je založena na pozitivním výsledku sérologického testu a pozitivnímu PCR na vysáté kostní dřeni nebo při kožní biopsii.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunosorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách zcitlivěných somatickými promastigotními antigeny *Leishmania infantum*. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Leishmania infantum* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test je manuální, ale lze jej provést i automatickými systémy, které musí být validovány uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

WELL	9500-01	Oddělitelné proužky ELISA senzibilizovaných somatickými promastigotními antigeny <i>Leishmania infantum</i>	96	destiček
DILB	9500-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	50	ml
WASH	9500-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9500-05	Zastavovací roztok (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
CONTROL -/+	9500-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
CONTROL +	9500-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
CONJ	9500-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
SUBS	9500-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablety
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Soupravu skladujte při teplotě mezi +2°C až +8°C (přeprava validovaná mezi -20°C a +37°C po dobu 21 dnů), chraňte před dlouhodobým vystavením jejích součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě mezi +2°C až +8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μl). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na +37°C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

Příprava činidel před použitím:

Všechny činidla nechte alespoň 1 hodinu zahřát v rozmezí +20°C až +30°C a před použitím promíchejte.

Destičky ELISA: Otevřete bok hliníkové tašky 9500-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9500-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +8°C.

Vyplachovací roztok: Zředte koncentrát (10 x) vyplachovacího roztoku 9500-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +8°C.

Kontrolní séra: Zředte 10 µl kontrolního séra 9500-06 až -08 ve 190 µl tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/20). Naředěné kontrolní séra je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +8°C.

Konjugát: Zředte konjugát 9500-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

Roztok substrátu: rozpustěte tabletu(-y) substrátu fosfatázy 9500-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9500-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředěte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

Zastavovací roztok: Použijte neředěné činidlo 9500-05.

Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Pokud je test proveden do 7 dnů, skladujte sérum při teplotě mezi +2°C až +8°C, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování. Rozmixujte vzorky a naředěte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml). Naředěné vzorky neuchovávejte.

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Složka	Odkaz	Nitrid sodný (Na_3N_3)	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9500-02	0,1%	0,02%
Vyplachovací roztok (10 x)	9500-03	0,05%	/
Tlumicí enzym	9500-04	0,01%	/
Kontrolní séra (20 x)	9500-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9500-09	0,1%	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

Složka	Nebezpečná složka	Nebezpečí piktogram	Prohlášení o nebezpečnosti	Preventivní prohlášení
Zastavovací roztok	Tribasový fosforečnan draselný		Způsobuje vážné poškození očí	Používejte ochranné brýle. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní séra (9500-06 až -08) jsou zvířecího původu (psi) a musí se s nimi zacházet opatrně.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.

- Zabraňte poškození mikrojamek mechanickým působením (špičky/kužele, trysky).
- Popisy symbolů použitých na etiketách naleznete na webových stránkách www.bordier.ch.

Pokyny k likvidaci odpadu:

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

Postup:

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

Krok 1: Předinkubace:

Naplňte jamky 250 µl ředícího pufru.

Inkubujte 5 až 15 minut při teplotě +20°C až +30°C.

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (vzorku bez séra).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky, doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při teplotě +37°C.

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky vzorku bez séra).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při teplotě +37°C.

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při teplotě +37°C.

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček vzorku bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena následující kritéria:

- absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200
- A slabě pozitivního kontrolního vzorku > 10% A pozitivního kontrolního vzorku
- A negativního kontrolního vzorku < 8% A pozitivního kontrolního vzorku
- A vzorku bez séra < 0,350

V případě, že signál vzorku překračuje měřicí rozsah čtečky mikrodestiček, měla by být přiřazena hodnota odpovídající hornímu měřicímu rozsahu čtečky

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: www.bordier.ch.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9500-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů leishmaniózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než **1,0**. V tomto případě, je koncentrace protilátek IgG proti antigenu *Leishmania infantum* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší nebo rovná se **1,0**. V tomto případě, je koncentrace protilátek IgG proti antigenu *Leishmania infantum* považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech, doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

V případě pozitivního nebo nejasného výsledku, doporučujeme provést potvrzovací test (nejčastěji metodou Western blot), pokud je takový test k dispozici nebo ho vyžadují vnitrostátní předpisy.

Analytické výkony:

Analytická specifičnost:

Specifita 100% byla zjištěna u 15 sér pacientů s jinými parazitárními infekcemi. Křížová reaktivita se může vyskytovat u pacientů s africkou trypanosomózou, Chagasovou chorobou a kožní a mukokutánní leishmaniózou. U suprafyziologických koncentrací hemoglobinu, lipidů nebo bilirubinu v séru doplněných interferenty nebyla pozorována žádná pozitivní ani negativní interference.

Přesnost:

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 duplicitní vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	1,005	1,766	1,381	2,187
Standardní odchylka (absorbance)	0,061	0,086	0,097	0,117
Koeficient odchylky (%)	6,1	4,9	7,0	5,3

Klinické výkony:

Diagnostická citlivost:

Citlivost 93% byla zjištěna u 29 sér imunokompromitovaných pacientů (HIV-) trpících viscerální leishmaniózou způsobenou *L. infantum*. Citlivost 67% byla zjištěna u 21 sér pacientů koinfikovaných HIV-*Leishmania*. Negativní sérologie a pozitivní kultura mohou být zjištěny u pacientů s potlačenou imunitou nebo u pacientů infikovaných jiným druhem *Leishmania*, jako například *L. major* nebo *L. braziliensis*.

Diagnostická specifičnost:

Specifita 100% byla zjištěna u 99 sér dárců krve (Švýcarsko).

Pozitivní a negativní prediktivní hodnota:

U výše uvedené populace HIV- byly zjištěny hodnoty PPV 100% a NPV 98% a u výše uvedené populace HIV+ byly zjištěny hodnoty 100% a 93%.

Očekávané hodnoty u normální a postižené populace:

V běžné populaci 99 švýcarských dárců krve činí očekávaná hodnota indexu 0,39. V zasažené populaci 13 sér pacientů trpících viscerální leishmaniózou činí očekávaná hodnota indexu 2,64.

Incidenty:

Každý závažný incident, k němuž v souvislosti s tímto prostředkem dojde, je nutné oznámit výrobci a příslušnému orgánu členského státu, v němž je uživatel anebo pacient usazen.

Omezení:

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

Reference:

Daleine, G., Deniau, M., Matheron, S., Leport, C., Lebras, J. (1994) Leishmaniose viscérale au cours de l'infection à VIH : avantages du sérodiagnostic par technique ELISA. Pres. Med. 23 : 672-673.

Nassar, N., Gangneux, J.P., Sulahian, A., Derouin, F. (1996) Leishmaniose viscérale au cours du sida : Difficultés du diagnostic sérologique, évaluation d'une nouvelle trousse ELISA. Feuilles de Biologie. 37: 39-42.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. 116: 193-19

Lévêque, M.F., Battery, E., Delaunay, P., Lmimouni, B.E., Aoun, K., L'Ollivier, C., et al. (2020) Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 14 : e0008139.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

